

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 483号	学位授与年月日	平成19年 3月14日
氏 名	江 暁 菁		
論文題目	<p>Inducible nitric oxide synthase mediates delayed cardioprotection induced by morphine in vivo: evidence from pharmacologic inhibition and gene-knockout mice (誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)はモルヒネによって誘導される遅延型心筋保護作用を仲介するー薬理学的アプローチと iNOS ノックアウトマウスからの知見)</p>		

博士(医学) 江 暁 菁

論文題目

Inducible nitric oxide synthase mediates delayed cardioprotection induced by Morphine in vivo :evidence from pharmacologic inhibition and gene-knockout mice

誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)はモルヒネによって誘導される遅延型心筋保護作用を仲介する一薬理学的アプローチとiNOSノックアウトマウスからの知見

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

早期型心筋保護作用は、虚血後すぐから3時間まで、遅延型心筋保護作用は、虚血後12時間から72時間までに見られる。薬理学および遺伝学的なアプローチにより、様々な病態による刺激や薬物によって引き起こされる心筋保護作用は誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)によって仲介されることが明らかになってきた。麻酔薬の中ではモルヒネが早期型心筋保護作用を示すが、遅延型心筋保護効果については不明である。今回我々はモルヒネによる遅延型心筋保護効果と、それにおけるiNOSの役割を調べたので報告する。

〔材料ならびに方法〕

野生型マウスを無作為に5群に分けた。

- ①生食群：生食0.1mlを腹腔内投与(intraperitoneal administration: IP) (n=7)
- ②M0.1群：モルヒネ0.1mg/kg, IP (n=6)
- ③M0.3群：モルヒネ0.3 mg/kg, IP (n=7)
- ④生食+SMT群：生食0.1ml, IP 及び結紮30分前iNOS阻害剤のS-methylisothiourea (SMT) 3 mg/kg, IP (n=6)
- ⑤M0.3群+SMT群：モルヒネ0.3 mg/kg, IP 及び結紮30分前SMT 3 mg/kg, IP投与 (n=8) iNOSノックアウト(KO)マウスは無作為に2群に分けた。
- ⑥iNOS-KO+年食群:生食0.1ml, P(I-7)
- ⑦iNOS-KO+M0.3線:モルヒネ0.3mg /kg, IP (n=8)

マウスをpentobarbital sodium 50mg /kg, IPで麻酔し、気管切開後に人工呼吸を行った。心電図、右頸動脈カニューレーションによる血圧連続測定を行ない、直腸温は36.5～37.5℃に維持した。10分間安定させた後、開胸した。左冠状動脈(left anterior descending coronary artery, LAD)を綿糸で結紮、心筋虚血を作成した。45分後、結紮を解除し、心筋組織の再灌流を確認した。再灌流を120分間行い、再びLADを結紮し、evans blue を頸動脈から逆行性に注入して、虚血危険区域(area at risk: AAR)を非虚血区域と区別した。

心臓を摘出し、5枚の横切片を作成した後、37℃の1% triphenyltetrazolium chlorideに5分間浸した。心房と右心室を取り除き、各々の左室切片の重量を測定し、写真に記録した。各切片写真の左室(left ventricle:LV)においてAARと心筋梗塞部(infarct size:IS)をNIH イメージソフトで面積を計算した。ISの重量およびAARの重量は以下の式で計算した。

$$(A1 \times W1) + (A2 \times W2) + (A3 \times W3) + (A4 \times W4) + (A5 \times W5)$$

A1～5: 各切片(1～5)におけるIS部面積もしくはAAR部面積のLV面積に対する百分率(%), W1～5: 各

切片(1~5)の重量。

虚血危険区域はAAR部重量のLV重量に対する比率(AAR/LV)で、心筋梗塞区域はIS部重量のAAR部重量に対する比率(IS/AAR)で評価した。

生食群(①)、M0.1群(②)、M0.3群(③)、iNOS-KO+生食群(⑥)とiNOS-KO+M0.3群(⑦)から心室組織を採取し、処理24時間後iNOSおよびeNOS発現の変化をWestern blot法で検討した。M0.3群(③)では、0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24時間後にiNOS発現の変化をWestern blot法で検討した。

〔結果〕

AAR/LV はすべての群において有意な差は見られなかった。IS/AARは生食群で $43.1 \pm 5.3\%$ 、M0.3群ではIS/AARは $22.4 \pm 4.4\%$ に低下した($p < 0.05$)。しかしM0.1群は梗塞区域を減少させなかった($41.1 \pm 5.4\%$)。M0.3+SMT群(⑤)ではIS/AARが $43.3 \pm 3.9\%$ で、心筋保護効果は消失した。SMT単独投与(④)は心筋梗塞に影響を与えなかった。iNOS-KO+M0.3群(⑦)とiNOS-KO+生食群(⑥)の間にIS/AARの有意差はなかった。野生型マウス生食群(①)とiNOS-KO+生食群(⑥)の間では、IS/AARに有意差は見られなかった。

モルヒネを前投与した群では心筋におけるiNOSの発現は生食群と比較し、有意に増強されていた($p < 0.05$)。モルヒネ0.3 mg/kg投与後のiNOS発現は漸増して、24時間で最も高くなったのが観察された。一方eNOS発現は、各群間で有意差が見られなかった。

〔考察〕

本研究はモルヒネが0.1~0.3 mg/kgの範囲で用量依存性に遅延型心筋保護効果をもつことを証明した。一方モルヒネに誘導された心筋保護効果は選択性iNOS阻害剤であるSMTの前投与により消失した。さらにiNOSノックアウトマウスのモルヒネ前投与では遅延型心筋保護効果が出現しなかったことから、モルヒネの遅延型心筋保護作用にiNOSが重要な役割を持つことが示唆された。この結果はWestern blot法でモルヒネの前投与が心筋のiNOS発現を増強することによって確認できた。また、モルヒネ投与24時間後のiNOS発現が増加しなかったことから、本研究の心筋保護作用にeNOSの役割は重要ではないと考えられた。遅延型の心筋保護効果は全身性の低酸素症、エンドトキシン、高体温などで誘導されるが、これにはミトコンドリアにおける K_{ATP} チャンネルの開閉が関与しているという多数の報告がある。NOがcyclic guanosine monophosphate (cGMP)の通路で K_{ATP} チャンネルを調節し、モルヒネの遅延型心筋保護作用をメディエートしていることが推定される。

〔結論〕

モルヒネには遅延型心筋保護作用があり、この作用の発現にはiNOSの誘導が重要な役割を果たしていることが確認された。

論文審査の結果の要旨

Ischemic preconditioningにより早期型心筋保護作用(1~3時間)と遅延型心筋保護作用(12~72時間)がみられることが知られており、その作用が誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)によって仲介されることが示唆されている。オピオイドにはischemic preconditioningに類似した早期型および遅延型心筋保護作用があることが知られており、最も広く使われているオピオイドであるモルヒネにも早期型心筋保護作用を誘

導することがわかっている。しかしながらモルヒネによる遅延型心筋保護作用については未だ不明である。そこで今回、申請者らは野生型マウスおよびiNOSノックアウト(KO)マウスにおいて冠状動脈の虚血再灌流モデルを作成し、モルヒネによる遅延型心筋保護作用とiNOSの役割を調べた。

マウスをpentobarbital麻酔下に気管切開し、人工呼吸を行った。心電図および血圧を測定し、10分間定常状態が得られた後、開胸、左冠状動脈を結紮し心筋虚血を作成した。45分後に結紮を解除し、120分間再灌流した。虚血危険区域(area at risk:AAR)の同定のため頸動脈から逆行性にevans blueを注入した後、心臓を摘出した。横切片を作成しtriphenyltetrazolium chlorideにより心筋梗塞部の大きさ(infarct size:IS)を測定し、IS/AAR値を求めた。

虚血作成24時間前にモルヒネ(0.1または0.3 mg/kg)または生食を腹腔内投与し、また各群の一部の動物には虚血30分前にiNOSの選択的阻害剤であるS-methylisothiourea (SMT)を腹腔内投与し、IS/AAR値に及ぼす影響を検討した。その結果、0.3 mg/kgのモルヒネ前投与のIS/AAR値は $22.4 \pm 4.4\%$ であり、生食群に比し($43.1 \pm 5.3\%$)有意に縮小することがわかった(0.1 mg/kgでは有意差なし; $41.1 \pm 5.4\%$)。この効果はSMT投与により消失することから($43.3 \pm 3.9\%$)モルヒネの前投与による心筋保護作用はiNOSを介して起こることが示唆された。iNOS-KOマウスを用いた同様の実験の結果、iNOS-KOマウスでは虚血作成24時間前にモルヒネ0.3 mg/kgを投与してもIS/AARの縮小効果は認められず($42.3 \pm 4.7\%$)、モルヒネによる心筋保護作用はiNOSを介していることが支持された。

野生型マウスにおいて、0.3 mg/kgのモルヒネ投与後の心筋におけるiNOS発現量をWestern blotにより経時的に測定すると、iNOS発現量は徐々に増加し、モルヒネ投与後18および24時間で生食群に比べ有意な上昇が認められた。0.1 mg/kgのモルヒネ投与ではこのような上昇は認められず、iNOS-KOマウスでは全くiNOSの発現は見られない。また内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現量はモルヒネ投与群(0.1および0.3 mg/kg)においてもiNOS-KOマウスにおいても野生型対照群との間に差を認めなかった。

以上の結果より0.3 mg/kgのモルヒネ投与により遅延型心筋保護作用は発現すること、そしてこの作用の発現には(eNOSでなく)iNOSの誘導が重要な役割を果たしていることが示された。遅延型心筋保護効果は全身性の低酸素症、エンドトキシン、高体温などで誘導されるが、これにはミトコンドリアにおける K_{ATP} チャネルの開口が関与していると考えられている。モルヒネの遅延型心筋保護作用は、iNOSの誘導により産生されたNOがcGMPを介して K_{ATP} チャネルを調節することによることが推定された。

審査委員会では、申請者らが今まで示されていなかったモルヒネによる遅延型心筋保護作用を初めて証明し、またその作用におけるiNOSの関与を明らかにしたことを高く評価した。本研究および今後のさらなるiNOSの上流および下流のシグナル経路の解明などにより心筋保護機構が明らかになることは、臨床的観点からもきわめて重要と考えられる。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 動物実験における倫理的配慮について
- 2) 早期型と遅延型心筋保護作用の相違について
- 3) 虚血によるpreconditioningとモルヒネ前投与の相違について
- 4) eNOS, iNOS, nNOSの相違について
- 5) iNOSの心筋保護作用について
- 6) モルヒネ投与24時間以降の心筋におけるiNOS発現について
- 7) SMTの阻害作用について

8) TTCによって虚血部位が何故わかるのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文に相応しいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	難	波	宏	樹	
	副査	渡	邊	裕	司	副査 近 藤 一 直